

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-104649

(43) 公開日 平成8年(1996)4月23日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	弁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/22	Z			
9/127	D			
C 0 7 D 213/70				
401/12	2 3 3			
// (C 0 7 D 401/12				

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-240424	(71) 出願人	000004341 日本油脂株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(22) 出願日	平成6年(1994)10月4日	(72) 発明者	宮崎 剛 茨城県つくば市梅園2-15-5
		(72) 発明者	北野 茂 茨城県つくば市春日2-17-14
		(72) 発明者	門磨 義仁 兵庫県神戸市北区小倉台3-2-6
		(72) 発明者	杉中 昭典 神奈川県茅ヶ崎市室田2-4-10
		(74) 代理人	弁理士 柳原 成

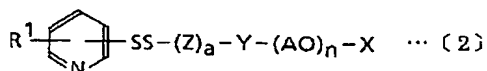
(54) 【発明の名称】 反応性小胞体、小胞体修飾剤および製造方法

(57) 【要約】

【目的】 チオール基と特異的に反応するピリジンジスルフィド基がポリオキシアルキレン鎖を介してリボソームの外水相膜にのみ結合し、内水相膜には存在しない反応性リボソームを得る。

【構成】 アミノ基を有するリン脂質を膜形成成分として含むリボソームに、下式で表わされるポリオキシアルキレン誘導体を反応させる。

【化1】



(AOは炭素数2~4のオキシアルキレン基、nは1~1000、R¹はHまたはメチル基、Yは炭素数2~4のアルキレン基、Xはオキシカルボニルイミダゾール基または活性化エステル基、aは0または1、Zは-CH₂、CH₂CONH-など)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体において、この小胞体の外水相面にのみ、一般式〔1〕

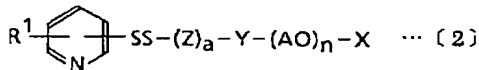
【化1】



〔式中、 R^1 は水素原子またはメチル基を表わす。〕で表わされるピリジンジスルフィド基が（ポリ）オキシア

【請求項2】 アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体と、下記一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤との反応生成物からなる請求項1記載の反応性小胞体。

【化2】

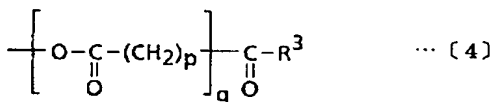


〔式中、AOは炭素数2～4のオキシアアルキレン基、 n はオキシアアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアアルキレン基は同一でも異なっているてもよく、またランダム状に付加しているても、ブロック状に付加しているてもよい。 R^1 は水素原子またはメチル基、 X は

【化3】



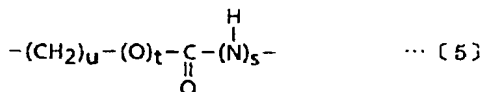
または



〔式中、 R^2 は水素原子またはメチル基、 R^3 は活性化エステル残基、 p は2～4の整数、 q は0または1を表わす。〕、

Y は炭素数2～4のアルキレン基、 a は0または1、 Z は

【化4】

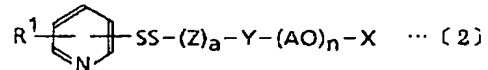


〔式中、 s および t はそれぞれ独立に0または1、 u は1～3の整数を表わす。〕を表わす。〕

【請求項3】 下記一般式〔2〕で表わされる（ポリ）オキシアアルキレン誘導体からなることを特徴とする小胞

体修飾剤。

【化5】



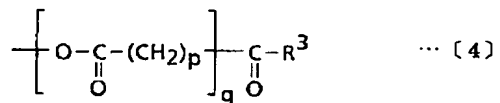
〔式中、AOは炭素数2～4のオキシアアルキレン基、 n はオキシアアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアアルキレン基は同一でも異なっているてもよく、またランダム状に付加しているても、ブロック状に付加しているてもよい。 R^1 は水素原子またはメチル基、

X は

【化6】



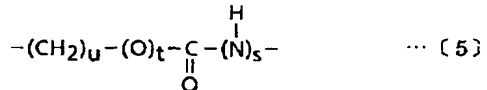
または



〔式中、 R^2 は水素原子またはメチル基、 R^3 は活性化エステル残基、 p は2～4の整数、 q は0または1を表わす。〕、

Y は炭素数2～4のアルキレン基、 a は0または1、 Z は

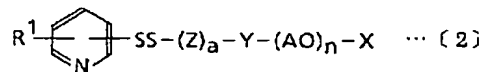
【化7】



〔式中、 s および t はそれぞれ独立に0または1、 u は1～3の整数を表わす。〕を表わす。〕

【請求項4】 アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体と、下記一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤とを、水系溶媒中で反応させることを特徴とする請求項1記載の反応性小胞体の製造方法。

【化8】



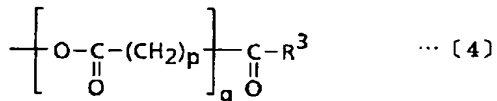
〔式中、AOは炭素数2～4のオキシアアルキレン基、 n はオキシアアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアアルキレン基は同一でも異なっているてもよく、またランダム状に付加しているても、ブロック状に付加しているてもよい。 R^1 は水素原子またはメチル基、

X は

【化9】



または

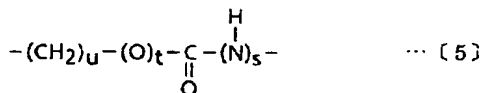


(式中、 R^2 は水素原子またはメチル基、 R^3 は活性化エステル残基、 p は2~4の整数、 q は0または1を表わす。)

Y は炭素数2~4のアルキレン基、

a は0または1、 Z は

【化10】



(式中、 s および t はそれぞれ独立に0または1、 u は1~3の整数を表わす。)を表わす。]

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、反応性小胞体、これを製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法に関する。さらに詳しくは医薬の運搬体、検査薬、診断薬、アジュバント、センサー、固定化触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロカプセル代替品、化粧品原料など、種々の機能性リボソームまたは脂肪乳剤等として有用な反応性小胞体、これを製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】リボソームはリン脂質の二分子膜からなる小胞体であり、多分野での応用が試みられている。特に、医薬運搬体、診断・検出用のセンサーなどへの応用が注目されているが、リボソーム外水相面(外水相膜)上または膜中に機能性物質を固定して各種機能をもたせること、およびリボソームの血中濃度を維持することなどが大きな課題となっている。

【0003】従来、リボソーム外水相膜上または膜中への機能性物質の固定化に関しては、プルラン誘導体で被覆したリボソームの外水相膜上の多糖上に置換したアミノエチルカルバミルメチル基に γ -マレイミドブチルオキシサクシニミジルを介して抗体フラグメントを結合させる方法(Biochem. Biophys. Acta., 898, 323(1987))、あるいはあらかじめリボソーム膜形成成分中に糖脂質を加えておき、リボソーム形成後過氧化酸酸化を行い、生じたアルデヒド基と抗体とを反応させて固定化する方法(J. Biol. Chem., 255, 10509(1980))などがある。

【0004】しかし、これらの従来法では、リボソーム調製後にリボソーム膜外水相膜上での多段階の化学反応を行う必要があり、このため目的とする機能性物質の導入量が低く制限され、また反応による副生成物や不純物が混入し、リボソーム膜へのダメージが大きいなどの問題点がある。

【0005】一方、リボソームを生体内へ投与したとき、その多くは肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉されるため、十分な効果が得られないことが指摘されている(Cancer Res., 43, 5328(1983))。そこで、この網内系器官で捕捉されてしまう問題点や、リボソームに封入した薬剤のもれ防止、あるいはリボソーム自身の崩壊性・凝集性など安定性の低さに関する問題点を改善する方法として、リボソームの外水相膜にポリオキシエチレングリコール鎖(ポリオキシエチレン鎖)を導入することが試みられている(例えば、特開平1-249717号公報、FEBS letters, 268, 235(1990))。また、ポリオキシエチレンで修飾されたリボソームは、長期間にわたり血液中濃度を維持できることが明らかになっている(Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991))。しかし、このような方法により得られるポリオキシエチレン鎖の導入されたリボソームは機能性物質と反応しないので、リボソーム外水相膜上に機能性物質を固定化することはできない。

【0006】さらに、特開平4-346918号公報には、マレイミド基を有するリボソームにまずチオール基を付与したタンパク質(チオール化タンパク質)を反応させ、次いで残存マレイミド基にチオール基を付与したポリアルキレングリコール(チオール化ポリアルキレングリコール)部分を含む化合物を反応させることにより、網内系器官での取込の改善された薬剤含有抗体結合リボソームが得られることが記載されている。しかし、このリボソームでは、抗体がポリオキシアルキレン層の下部に隠蔽され、標的部位の抗原との反応が妨げられるため、期待される効果が十分には得られないという問題点がある。

【0007】さらに、米国特許第4483929号には、抗体を化学結合により担持した抗体担持リボソームが開示されている。この抗体担持リボソームは、反応活性基としてオキシカルボニルイミダゾール基を有する糖脂質を膜形成成分とする反応性リボソームと抗体とを反応させることにより得られる。

【0008】しかし、この抗体担持リボソームでは、リボソームの内水相膜(内側)にも反応活性を有するオキシカルボニルイミダゾール基が存在することになり、このためこのようなリボソームをドラッグデリバリーシステム(DDS)用の医薬運搬体などとして用いた場合、生体内でリボソームが崩壊した際内側に存在していたオキシカルボニルイミダゾール基が生体内のタンパク質などと反応し、副作用や毒性を起こすなどの危険性がある。

る。またリポソームに封入した医薬と内側のオキシカルボニルイミダゾール基とが反応し、期待される医薬効果が得られないなどの問題点もある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記問題点を解決するため、チオール基と特異的に反応する反応活性基が（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して小胞体の外水相面（外側）にのみ結合し、内側には反応活性基が存在しない反応性小胞体であって、機能性物質を一段階の反応で固定化することができ、しかも固定した機能性物質の作用を十分に発揮させることができる小胞体、これを製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は次の反応性小胞体、小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法である。

（1）アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体において、この小胞体の外水相面にのみ、一般式〔1〕

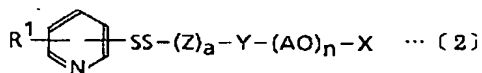
【化11】



〔式中、 R^1 は水素原子またはメチル基を表わす。〕で表わされるピリジンジスルフィド基が（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して前記アミノ基と化学結合により結合していることを特徴とする反応性小胞体。

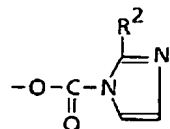
（2）アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体と、下記一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤との反応生成物からなる上記（1）記載の反応性小胞体。

【化12】



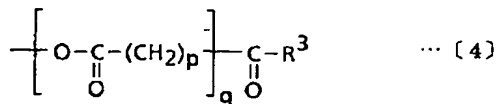
〔式中、 AO は炭素数2～4のオキシアルキレン基、 n はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。 R^1 は水素原子またはメチル基、 X は

【化13】



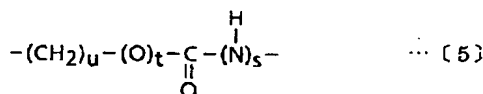
…〔3〕

または



（式中、 R^2 は水素原子またはメチル基、 R^3 は活性化エステル残基、 p は2～4の整数、 q は0または1を表わす。）、 Y は炭素数2～4のアルキレン基、 a は0または1、 Z は

【化14】



（式中、 s および t はそれぞれ独立に0または1、 u は1～3の整数を表わす。）を表わす。〕

（3）前記一般式〔2〕で表わされる（ポリ）オキシアルキレン誘導体からなることを特徴とする小胞体修飾剤。

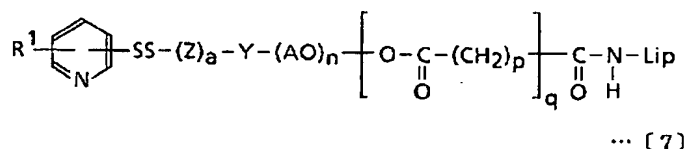
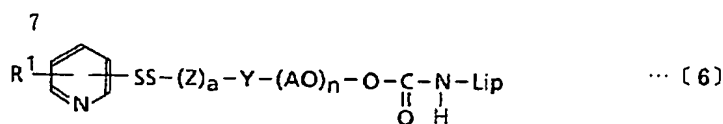
（4）アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体と、前記一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤とを、水系溶媒中で反応させることを特徴とする上記（1）記載の反応性小胞体の製造方法。

【0011】本発明において、「（ポリ）オキシアルキレン」はオキシアルキレンまたはポリオキシアルキレンを意味する。本発明において小胞体とは、小胞体形成成分の親水基が界面の水相に向かって配向した構造を有する粒子を意味する。本発明においては、小胞体はアミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含有しているので、反応性小胞体を製造する前の小胞体には、外水相面にアミノ基が存在している。小胞体の具体的なものとしては、二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソーム、植物油およびリン脂質などの混合物が乳化された脂肪乳剤、またはミセルなどがあげられる。

【0012】本発明の反応性小胞体は、一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基が、（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して、小胞体の外水相面にのみ結合した反応性小胞体であり、内側または内水相面（以下、両者をまとめて内側という）には反応活性は存在していない。

【0013】一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基は、下式〔6〕または〔7〕で示されるように、（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して、小胞体の外水相面に存在するアミノ基と化学結合することにより小胞体の外水相面にのみ結合している。

【化15】



〔式中、 ---NH---Lip はアミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体を表わす。 R^1 、 Y 、 Z 、 a 、 AO 、 n 、 p および q は前記と同じものを表わす。〕

【0014】ピリジンジスルフィド基を小胞体に結合させる際のスペーサーとなる（ポリ）オキシアルキレン鎖は、一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤の（ポリ）オキシアルキレン鎖部分である。一般式〔2〕、〔6〕または〔7〕において AO で表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ1-エチルエチレン基、オキシ1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0015】一般式〔2〕、〔6〕または〔7〕において n はオキシアルキレン基の平均付加モル数を表わし、1～1000、好ましくは4～500、さらに好ましくは10～230の正数である。 n が2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のもので、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。

【0016】スペーサーとなる（ポリ）オキシアルキレン鎖は親水性であるのが好ましく、この場合オキシアルキレン基としてはエチレンオキシドが単独で付加したものが、特に n が4以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。（ポリ）オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0017】一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基は、チオール基に対して特異的に高い反応性を有している反応活性基部分である。このため本発明の反応性小胞体は、小胞体の外水相面において、（ポリ）オキシアルキレン鎖の先端にチオール基を有する機能性物質を、容易に共有結合により結合させることができる。

【0018】本発明の反応性小胞体は、アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、一般

式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤を反応させることにより製造することができる。アミノ基を有するリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルスレオニンなどがあげられ、一種単独で、または二種以上組合せて使用できる。これらのリン脂質としては、2つの脂肪酸エステル部位に炭素数4～30、好ましくは8～18の飽和または不飽和の脂肪酸残基を有するものが望ましく、天然または合成のいずれのものでもよい。具体的には、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリスチルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、ジステアロイルホスファチジルセリン、ジミリスチルホスファチジルスレオニン、ジパルミトイルホスファチジルスレオニンなどがあげられる。

【0019】小胞体形成成分としては、アミノ基を有するリン脂質の他にも小胞体を形成しうる他の化合物も使用でき、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、その他のリン脂質類、コレステロール、イントラリピッド（大塚製薬（株）、商標）、大豆油、サフラワー油など、従来から小胞体の形成成分として用いられているものが使用できる。また小胞体としては上記イントラリピッドのような脂質混合乳化物を使用することもできる。

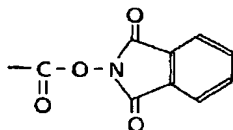
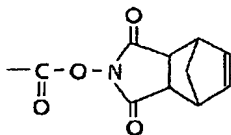
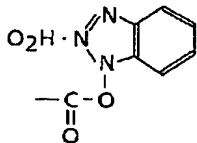
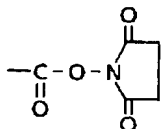
【0020】全小胞体形成成分中に占めるアミノ基を有するリン脂質の割合は制限されないが、通常0.01～100モル%とするのが好ましく、アミノ基を有するリン脂質の割合を多くするほど、一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基の導入量を多くすることができる。これにより小胞体の外水相面に存在するピリジンジスルフィド基の導入量を所望の値に調節することができる。

【0021】一般式〔2〕における X は、一般式〔3〕で表わされるオキシカルボニルイミダゾール基またはそのメチル置換体、あるいは一般式〔4〕で表わされる活性化エステル基（ $\text{R}^1\text{COO---}$ ）または活性化エステル基を有する基である。一般式〔4〕で表わされる基の具体的なものとしては、例えば次のものが例示できる。

【0022】

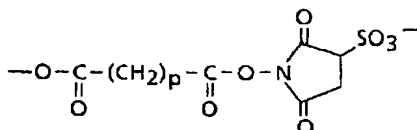
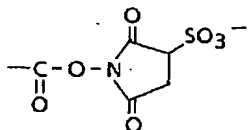
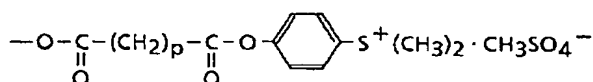
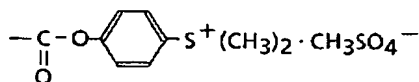
【化16】

9



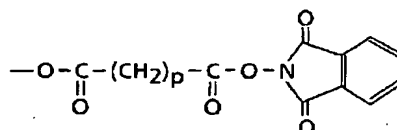
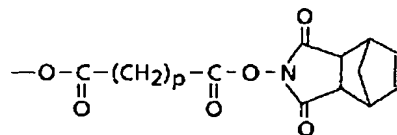
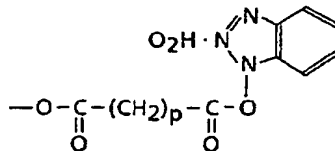
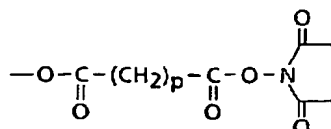
【 0 0 2 3 】

【 化 1 7 】



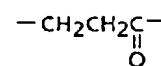
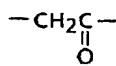
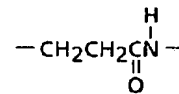
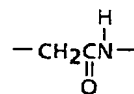
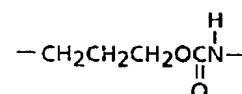
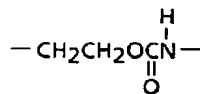
【 0 0 2 4 】 上記各式において活性化エステル残基部分は、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N, N'-ジコハク酸イミドカーボネート、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、4-ヒドロキシフェニルジメチルスルホニウム、メチルサルフェートなどの活性化エステル試薬の残基である。

【 0 0 2 5 】 一般式〔2〕、〔6〕または〔7〕においてYで示される炭素数2~4のアルキレン基の具体的な



ものとしては、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、1-エチルエチレン基、1, 2-ジメチルエチレン基、テトラメチレン基などがあげられる。一般式〔5〕で表わされる基の具体的なものとしては、例えば次のものが例示できる。

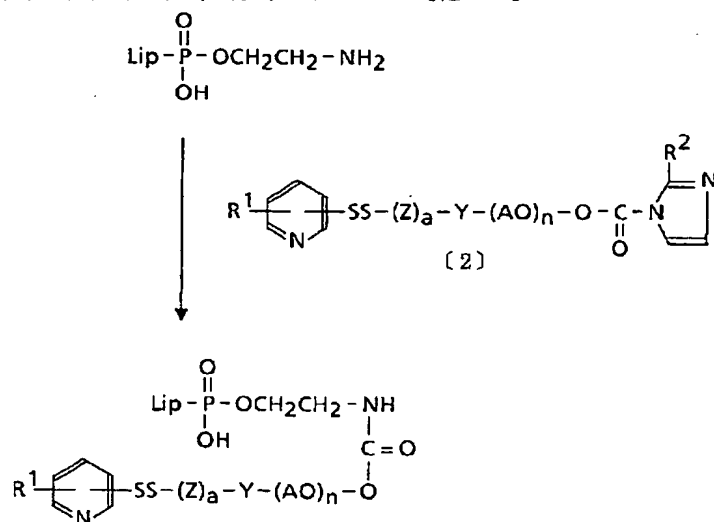
【 化 1 8 】



40 【 0 0 2 6 】 一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤は、1種単独で使用することもできるし、2種以上を組合せて使用することもできる。小胞体修飾剤は水溶性であることが好ましく、一般式〔2〕において(AO)_nで示されるアルキレンオキシドの付加部分は、すでに説明したように、エチレンオキシドが単独で付加したもの、特にエチレンオキシドが4以上付加したものが好ましい。またこれ以外にも、エチレンオキシドとテトラヒドロフランおよび/またはプロピレンオキシドとがランダムまたはブロック状に付加したものなどであってもよい。この場合オキシアルキレン基の平均付加モル数

(n) は好ましくは4~500、さらに好ましくは10~230である。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、総付加アルキレンオキシド中に占めるエチレンオキシドの割合は20モル%以上、好ましくは50モル%以上であるのが望ましい。

【0027】小胞体と一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤との反応は、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液など種々の緩衝液中で、pH1~12、好ましくはpH3~10、反応温度0~100℃、好ましくは0~60℃で、反応時間30分間~200時間、好ましくは1時間~24時間の条件で行うことができる。このようにして反応させることにより、小胞体外水相面のアミノ基と小胞体修飾剤中のオキシカルボニルイミダゾール



... (8)

【0029】このようにして得られた本発明の反応性小胞体は、ゲルろ過、透析、限外ろ過などにより容易に単離・精製することができる。なお条件によっては、小胞体同士が架橋された架橋小胞体が生じる場合もあるが、この場合には必要に応じて、ゲルろ過、または適当なポアサイズを有するメンブランフィルターなどを使用することにより、容易に分別することができる。

【0030】このように本発明の製造方法では、調製済みの小胞体に、後からピリジンジスルフィド基を導入しているため、小胞体の外水相面にのみ反応活性を有するピリジンジスルフィド基が存在し、内側には存在しない反応性小胞体を得られる。

【0031】本発明の小胞体修飾剤において、一方の末端がピリジンジスルフィド基、他方の末端がオキシカルボニルイミダゾール基の小胞体修飾剤は、例えばα-(メルカプト置換アルキル)-ω-ヒドロキシ(ポリ)オキシアルキレンとジエチルアゾジカルボキシレートとを反応させた後、さらにメルカプトピリジンを反応させ、さらにN、N'-カルボニルジイミダゾールを反応

基部分または活性化エステル基部分とが容易に反応してウレタン結合またはCONH結合を形成し、一般式

〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基が(ポリ)オキシアルキレン鎖を介して小胞体外水相面に導入され、反応性小胞体を得られる。

【0028】アミノ基を有するリン脂質としてホスファチジルエタノールアミンを用いた場合のリポソームと、一般式〔2〕においてXがオキシカルボニルイミダゾール基の小胞体修飾剤とから反応性リポソームを製造する反応式は下式〔8〕で示される。式中、Lipはホスファチジルエタノールアミンを含むリポソームを示す。R¹、R²、AO、n、Y、Zおよびaは前記と同じものを示す。

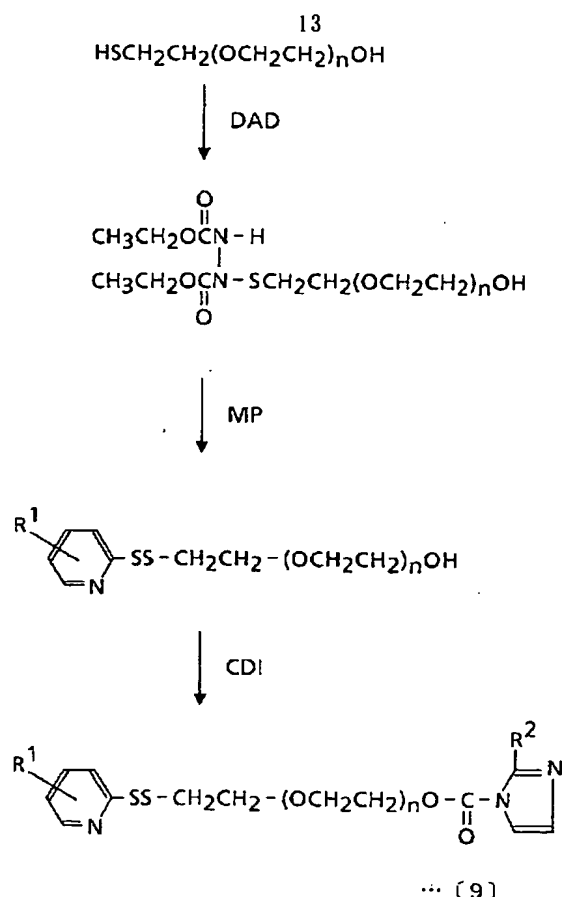
【化19】

させる方法などにより容易に製造することができる。

【0032】上記反応は、いずれのステップも無溶媒またはジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルなどの有機溶媒中で、反応温度-100~+160℃、好ましくは-10~+60℃で、反応時間10分間~200時間、好ましくは30分間~12時間の条件で容易に行うことができる。

【0033】α-(メルカプト置換アルキル)-ω-ヒドロキシ(ポリ)オキシアルキレンとしてα-(2-メルカプトエチル)-ω-ヒドロキシ(ポリ)オキシエチレンを用いた場合の反応式を次式〔9〕に示す。式中、n、R¹およびR²は前記と同じものを示す。またDADはジエチルアゾジカルボキシレート、MPは2-メルカプトピリジンまたはその誘導体、CDIはN、N'-カルボニルジイミダゾールまたはその誘導体を示す。

【化20】



【0034】また一方の末端がピリジンジスルフィド基、他方の末端が活性化エステル基の小胞体修飾剤は、例えば α -(メルカプト置換アルキル)- ω -ヒドロキシ(ポリ)オキシアルキレンに前記の方法でピリジンジスルフィド基を導入した後、さらに無水コハク酸などの2価のカルボン酸無水物を反応させ、さらにジクロロヘキシカルボジミドなどの脱水縮合剤を用いるなどして、前述の活性化エステル試薬残基を導入することにより製造することができる。あるいは α -(メルカプト置換アルキル)- ω -カルボキシ置換アルキル(ポリ)オキシアルキレンに前記と同様にしてピリジンジスルフィド基を導入した後、脱水縮合剤を用いて活性化エステル試薬残基を導入することにより製造することができる。

【0035】上記の活性化エステル試薬残基を導入する反応は、ベンゼン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミドなどの有機溶媒中、 $-100 \sim 150^\circ\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 60^\circ\text{C}$ で、30分間 \sim 200時間、好ましくは1 \sim 48時間の条件で容易に行うことができる。得られた反応混合物は、精製することなくそのまま、あるいは再沈殿、カラム、ゲルろ過、限外ろ過、透析、イオン交換処理などの方法により単離・精製した後、小胞体修飾剤として使用される。

【0036】次にそれぞれの反応性小胞体について詳し

14

く説明する。まず代表的な反応性小胞体である反応性リボソームについて説明する。本発明に係る反応性リボソームは外水相面(膜)、すなわち膜を構成するいちばん外側の膜の外表面にのみ一般式〔1〕で表わされる反応活性を有するピリジンジスルフィド基が存在し、それ以外には存在しない反応性リボソームである。

【0037】反応性リボソームを構成する膜形成成分(小胞体形成成分)としては、前記アミノ基を有するリン脂質の他に、従来からリボソームの膜形成成分として用いられているものが制限なく使用できる。具体的には、ジホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ホスファチジイノシトール、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール等のリン脂質および脂肪酸部に不飽和基を有する重合性リン脂質；スルホキシリボシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ラクトシルジグリセリド等の糖脂質類；コレステロール等の非極性脂質；その他には、非イオン性界面活性剤、ホスファチジルポリエチレングリコール、「Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1990)」に記載されているホスファチジルエタノールアミンとポリエチレングリコールとの反応物、およびこれらの混合物などがあげられる。

【0038】全膜形成成分中に占めるアミノ基を有するリン脂質の割合は、通常0.01 \sim 100モル%、好ましくは0.1 \sim 50モル%とするのが望ましい。0.01モル%未満の場合、リボソーム外水相面に存在する一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基の導入量が少なくなり、このためリボソーム外水相膜に共有結合させる機能性物質の量が少なくなるので好ましくない。

【0039】小胞体修飾剤と反応させる前のリボソームは、膜形成成分を有機溶媒等の適当な溶媒に溶解し、エクストルージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆層蒸発法、エタノール注入法、プレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法など、種々の公知の方法によりリボソーム化することにより製造することができる。また、これらの製造法を選択することにより、多重層リボソーム、小さな一枚膜リボソーム、大きな一枚膜リボソームなど、種々の大きさや形態を有するリボソームを製造することができる。このような方法により、リボソームの外水相膜および内側にアミノ基が存在するリボソームが得られる。

【0040】リボソームの内部には、一般のリボソームと同様に種々の物質を公知の方法により封入することが可能である。被封入物質としては、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物、電極感応性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タ

ンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸等の水溶性高分子類；ホスファチジルセリン等のリン脂質；これらの混合物などがあげられる。

【0041】上記のようなリボソームと一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤とを前記のようにして反応させることにより、反応性リボソームが得られる。この場合、全反応溶液中のリボソームの膜構成成分濃度は、 $0.001 \sim 1000 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 100 \text{ mg/ml}$ とするのが望ましく、また小胞体修飾剤の濃度は特に限定されないが、 $0.001 \sim 1000 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.01 \sim 500 \text{ mg/ml}$ とするのが望ましい。小胞体修飾剤の使用量が上記下限値より少ない場合、得られた反応性リボソームは外水相膜に共有結合させる機能性物質の量が少なくなるので好ましくない。一方、上限値を超えると反応溶液の粘度が高くなり、リボソームの安定性が低下するため好ましくない。

【0042】なお、リボソーム外水相膜のアミノ基の全量を小胞体修飾剤と反応させる必要がない場合には、アミノ基ブロック化剤、例えば一方の末端には反応性基を持たず、他方の末端にのみアミノ基に対する反応性基を有する（ポリ）オキシアルキレンオキシド誘導体、具体的には α -メチルカルボニル（N-オキシコハク酸イミド）- ω -メトキシ ポリオキシエチレン、 α -N-カルボニルイミダゾール- ω -メトキシ ポリオキシエチレンなどを、リボソーム外水相膜のアミノ基と反応させて、アミノ基をブロックすることができる。このようなアミノ基のブロック化は、反応性リボソームを製造する際の反応溶液中にアミノ基ブロック化剤を添加して行うこともできるし、小胞体修飾剤と反応させる前に行うこともできるし、または小胞体修飾剤と反応させた後に行うこともできる。このようにリボソーム外水相膜のアミノ基をブロックすることにより、リボソーム外水相膜に導入される一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基の量を所望の値に調節することができる。

【0043】このようにして得られた反応性リボソームは、リボソームの外水相膜に（ポリ）オキシアルキレン

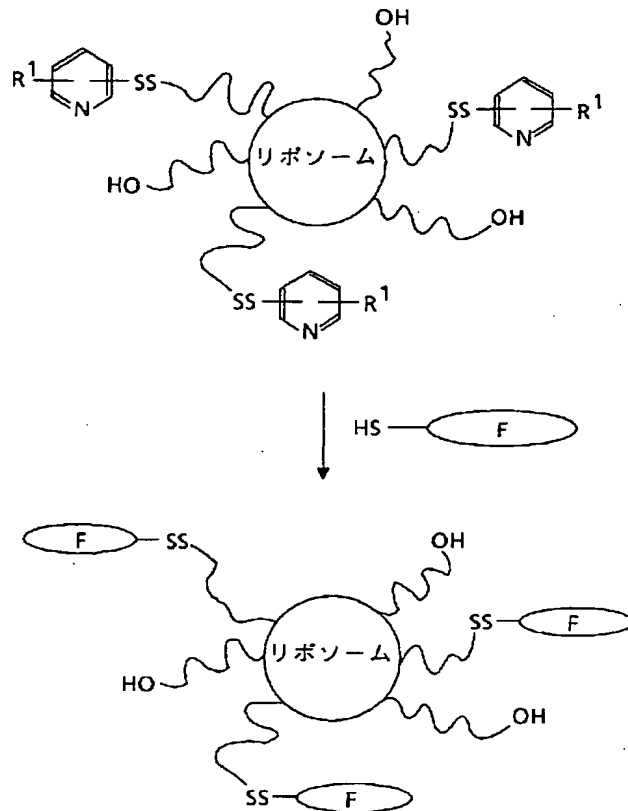
鎖からなるスペーサーを介してピリジンジスルフィド基が結合しているため、チオール基を有する機能性物質を効率よくかつ簡単に、リボソームの二分子膜の外水相膜上に（ポリ）オキシアルキレン鎖からなるスペーサーを介して、ジスルフィド結合により化学的に固定化することができる。

【0044】反応性リボソームに固定化できる機能性物質としては、チオール基を有する物質であれば特に限定されず、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、電極感応性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ホスファチジルセリン等のリン脂質；これらの混合物などがあげられる。

【0045】反応性リボソーム外水相膜への機能性物質の固定化反応は、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液などの種々の緩衝液；これらの水系溶媒とアセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、ピロリドン等の有機溶媒との混合溶媒中で、反応性リボソームと機能性物質とを pH 1~12、好ましくは pH 6~10、反応温度 $-120 \sim 140^\circ\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 60^\circ\text{C}$ で、反応時間 30 秒間~168 時間、好ましくは 30 分間~24 時間の条件で、攪拌下に反応させる方法などにより、一段階で容易に行うことができる。この場合、反応条件は温和であり、しかも一段階で行うことができるので、得られる反応性リボソームの安定性は高い。なお上記の条件外では、リボソームの安定性が悪くなるため好ましくない。固定化反応の終了後は、必要によりゲル濾過、限外濾過、透析、遠心分離、静置沈降分離等の方法により精製を行うことができる。

【0046】リボソーム外水相膜上でのチオール基を有する機能性物質の固定化反応を模式的に示すと次式〔10〕のようになる。式中、波線は（ポリ）オキシアルキレン鎖、F は機能性物質を示す。

【化21】



... [10]

【0047】機能性物質を固定化したリボソームは、
 (ポリ) オキシアルキレン鎖の先端に機能性物質が固定
 されているので (ポリ) オキシアルキレン鎖の長さを調
 節することにより機能性物質の作用を十分に発揮させる
 ことができる。また、(ポリ) オキシアルキレン鎖が導
 入されているので、従来からの (ポリ) オキシアルキレ
 ン鎖導入の効果、例えば長期間にわたる血液中濃度の維
 持、非免疫原生、リボソーム内部に封入した物質の漏れ
 防止などの効果も期待できる。さらにリボソームの内側
 (内表面) には反応活性の高い基は存在しないので、D
 DS用の医薬運搬体、診断薬、アジュバントなど、生体
 内に投与する機能性リボソームとして用いても生体内の
 官能基とは反応せず、副作用や毒性を示す危険性がない
 ほか、封入した機能性物質とも反応しない。このほか、
 不必要なピリジンジスルフィド基が残存したとしても、
 チオグリコール酸、チオプロピオン酸、システインな
 ど、チオール基を有する化合物を作用させてキャッピング
 を行う方法などにより、その全てを容易に失活させる
 ことができる。

【0048】このため反応性リボソームは、医薬の運搬
 体、検査薬、診断薬、アジュバント、センサー、固定化
 触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素
 子、マイクロカプセル代替品、化粧品原料など、種々の
 機能性リボソームとして利用できる。これらの中でも、
 医薬の運搬体、診断薬、アジュバントなどの生体内に投

与する機能性リボソームとして好適に利用できる。

【0049】なお、リボソームを製造する際、膜形成成
 分として重合性リン脂質を配合することにより、重合性
 の反応性リボソームとすることができる。重合性のリン
 脂質としては、公知の重合性リン脂質を使用することが
 できるが、例えば1, 2-ジ(2, 4-オクタデカジエ
 ノイル)-3-ホスファチジルコリンの他、野島庄七、
 砂本順三、井上圭三編集、1988年南雲堂発行の「リ
 ボソーム」p313~315に記載のものなどがあげら
 れる。これらの中では、1, 2-ジ(2, 4-オクタデ
 カジエノイル)-3-ホスファチジルコリンが好まし
 い。

【0050】重合性リボソームは、リボソーム調製後
 に、光重合開始剤の存在下または非存在下でUV、γ
 線、電子線などの光照射を行うことにより、あるいはレ
 ドックス開始剤系により、あるいはアゾ系開始剤または
 有機過酸化物などの存在下で加熱を行うことにより、容
 易に重合を行うことができる。このようにして得られた
 重合後のリボソームは、優れた安定性を有しているの
 で、水溶液に分散させたままで、あるいは凍結乾燥等
 により粉末状に調製し、安定して使用することができる。

【0051】他の反応性小胞体としての反応性脂肪乳剤
 は、アミノ基を有するリン脂質と、大豆油、サフラワー
 油等の植物油と、必要により添加される他の添加剤、例
 えば大豆レシチン、卵黄レシチン等のリン脂質、イント

ラリピッド（大塚製薬（株）製、商標）、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、脂溶性医薬、脂溶性生理活性物質などを含む油脂混合物が、外水相面にのみ一般式〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基が（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して存在するものである。

【0052】小胞体修飾剤との反応前の脂肪乳剤は、公知の方法により製造することができる。例えば、アミノ基を有するリン脂質、植物油、および必要により配合する添加剤を混合、加熱し、水を加えてホモミキサー等で粗乳化し、次にマントン－ガウリン型の加圧噴射式ホモジナイザー等で均質化する方法などにより製造することができる。また脂肪乳剤としては、上記イントラリピッドのような脂質乳化混合物を使用することもできる。

【0053】このようにして得られた小胞体修飾剤との反応前の脂肪乳剤と一般式〔2〕で表わされる小胞体修飾剤とを、反応性リポソームの場合と同様にして反応させることにより、本発明に係る反応性脂肪乳剤が得られる。反応性乳剤は反応性リポソームと同様にして、同様の機能性物質を容易に固定化することができる。このため反応性脂肪乳剤は、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、

センサー、固定化触媒、化粧品原料などとして利用できる。

【0054】上記以外の反応性小胞体である反応性ミセルは、アミノ基を有するリン脂質が単独で、または他の成分、例えばホスファチジルコリン、その他のリン脂質類、コレステロールなどが、外水相面にのみ一般式

〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基が（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して存在する状態でミセル化したものである。反応性ミセルも反応性脂肪乳剤と同様にして機能性物質を固定化することができ、また同様の用途に利用できる。

【0055】

【発明の効果】本発明の反応性小胞体は、反応活性基であるピリジンジスルフィド基が小胞体の外水相面にのみ存在し、内側には存在していないので、機能性物質を固定化した小胞体中には反応活性基が残存せず、このため

生体内に投与しても生体内の官能基とは反応が起らず、副作用や毒性を起す危険性がない。また機能性物質の固定化は簡単にかつ効率よく行うことができ、しかも小胞体の安定性を低下させることはない。さらに（ポリ）オキシアルキレン鎖の長さを調節することにより、固定化した機能性物質の作用を十分に発揮させることができる。

【0056】本発明の小胞体修飾剤は、上記のような反応性小胞体を製造するための原料として用いることにより、簡単な操作で、小胞体の外水相面にのみ一般式

〔1〕で表わされるピリジンジスルフィド基を（ポリ）オキシアルキレン鎖を介して結合させることができる。

【0057】本発明の反応性小胞体の製造方法では、アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、上記小胞体修飾剤を反応させるだけで、簡単に効率よく、しかも小胞体の安定性を低下させることなく前記のような反応性小胞体を製造することができる。

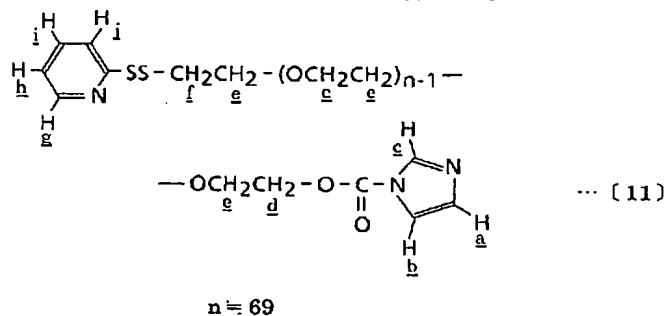
【0058】

【実施例】以下実施例によりさらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

合成例1

α - (2-メルカプトエチル) - ω - ヒドロキシポリオキシエチレン（分子量：3000）をベンゼン10mlに溶解させ、これにジエチルアゾジカルボキシレート58mg（0.33mmol）を加え、室温で4時間攪拌した。さらに2-メルカプトピリジン38.5mg（0.34mmol）を加え、2時間攪拌した後、析出物を濾過により除去した。得られた濾液にさらにN, N'-カルボニルジイミダゾール54mg（0.34mmol）を加え、1時間攪拌した。溶媒を減圧濃縮した後、残渣を蒸留水に溶解させ、限外濾過（分画分子量1000）により精製し、最後に凍結乾燥により白色粉末状の下式〔11〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体からなる小胞体修飾剤を得た（収率88%）。

【化22】



【0059】化合物の分析結果は次の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, δ : ppm, CDCl_3 , $J = \text{Hz}$)
8.46 (g; s, 1H)

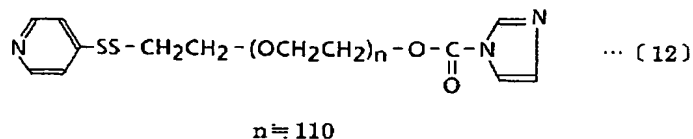
8.13 (c; s, 1H)
7.67 (i, j; m, 2H)
7.42 (b; s, 1H)
7.11 (h; s, 1H)

7.08 (a; s, 1H)
 4.62 (d; t, 2H, J=6.3)
 3.64 (e; m, 約260H)
 3.08 (f; t, 2H, J=6.4)
 IR (KBr: cm⁻¹)
 1720 (C=O伸縮)、1600、1580、1525 (芳香環)

【0060】実施例1-1

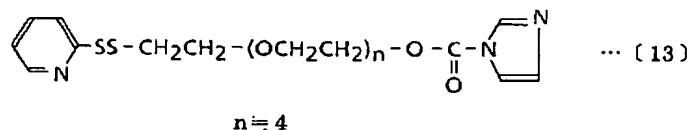
卵黄ホスファチジルコリン20mg (26μmol)、コレステロール3.9mg (10μmol) およびジパ
 ルミトイルホスファチジルエタノールアミン2.8mg
 (4μmol) をナス型フラスコに入れ、2mlのベン
 ゼンで溶解させた後、凍結乾燥を行った。これに生理的
 食塩水1mlを加え、バス型超音波照射およびボルテッ
 クスミキサーにより、多重層リボソームを得た。さらに
 エクストルーダーにより3.0→1.0→0.2μmの
 ポリカーボネートメンブランを順次通過させることに
 より、大きな一枚膜リボソームを得た。

【0061】次に、得られたリボソーム懸濁液の500
 μlに、合成例1で得られた反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体の10wt%を含む生理的食塩水1mlを加
 え、室温で6時間反応させた。反応終了後、Sepha



【0063】実施例1-3

実施例1-1と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体の10wt%を含む生理的食塩水に代
 30 て、下式〔13〕で表わされる反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体5wt%およびα-メチルカルボニル (N-
 オキシコハク酸イミド) -ω-メトキシ ポリオキ
 エチレン (分子量3000) 10wt%を含む生理的食塩



【0064】実施例1-4

実施例1-1と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体の10wt%を含む生理的食塩水に代
 て、下式〔14〕で表わされる反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体 (ランダム共重合体) 5wt%およびα-
 メチルカルボニル (N-オキシコハク酸イミド) -ω-
 メトキシ ポリオキエチレン (分子量3000) 10w

dex G-50を用いてゲル濾過を行い、含リボソ
 ーム分画を分取し、反応性リボソームを得た。得られた反
 応性リボソームの粒径をレーザー散乱粒度分布計 (NI
 COMP社製、NICOMP 370HPL、商標) を用
 い測定したところ、平均粒径172nm (CV値16
 %)であった。また、5℃で3週間保存した後の平均粒
 径は180nm (CV値17%)であり、安定性に優れ
 ていた。

【0062】実施例1-2

実施例1-1と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体の10wt%を含む生理的食塩水に代
 て、下式〔12〕で表わされる反応性ポリオキシア
 ルキレン誘導体5wt%およびα-メチルカルボニル (N-
 オキシコハク酸イミド) -ω-メトキシ ポリオキエ
 チレン (分子量3000) 10wt%を含む生理的食塩
 水1mlを用いることにより、ピリジンジスルフィド基
 がポリオキシア
 ルキレン鎖を介してリボソームの外水相
 膜にのみ結合した反応リボソームを得た (平均粒径18
 8nm、CV値17%)。また、5℃で3週間保存した
 後の平均粒径は190nm (CV値18%)であり、安
 定性に優れていた。

【化23】

水1mlを用いることにより、ピリジンジスルフィド基
 がポリオキシア
 ルキレン鎖を介してリボソームの外水相
 膜にのみ結合した反応性リボソームを得た (平均粒径1
 89nm、CV値18%)。また、5℃で3週間保存し
 た後の平均粒径は197nm (CV値20%)であり、
 安定性に優れていた。

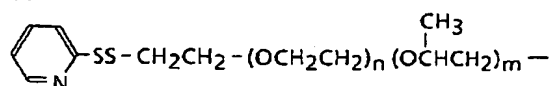
【化24】

40 t%を含む生理的食塩水1mlを用いることにより、ピ
 リジンジスルフィド基がポリオキシア
 ルキレン鎖を介してリボソームの外水相膜にのみ結合した反応性リボソ
 ームを得た (平均粒径192nm、CV値19%)。ま
 た、5℃で3週間保存した後の平均粒径は208nm
 (CV値24%)であり、安定性に優れていた。

【化25】

23

24

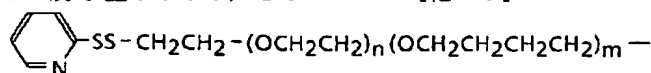


m ≅ 5、n ≅ 30 (ランダム共重合体)

【0065】実施例 1-5

実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体の 10 wt % を含む生理的食塩水に代え
て、下式〔15〕で表わされる反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体（ブロック共重合体）5 wt % および α-メ
チルカルボニル（N-オキシコハク酸イミド）-ω-メ
トキシ ポリオキシエチレン（分子量 3000）10 w

t % を含む生理的食塩水 1 ml を用いることにより、ピ
リジンジスルフィド基がポリオキシア
ルキレン鎖を介してリボソームの外水相膜にのみ結合した反応性リボソ
ームを得た（平均粒径 222 nm、CV 値 22 %）。ま
た、5℃で3週間保存した後の平均粒径は 250 nm
（CV 値 25 %）であり、安定性に優れていた。
【化 26】

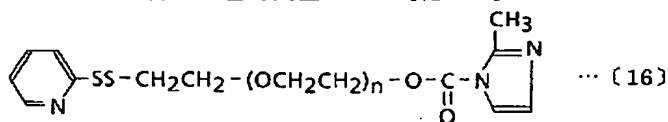


m ≅ 5、n ≅ 30 (ブロック共重合体)

【0066】実施例 1-6

実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体の 10 wt % を含む生理的食塩水に代え
て、下式〔16〕で表わされる反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体 5 wt % および α-メチルカルボニル（N-
オキシコハク酸イミド）-ω-メトキシ ポリオキシエ
チレン（分子量 3000）10 wt % を含む生理的食塩

水 1 ml を用いることにより、ピリジンジスルフィド基
がポリオキシア
ルキレン鎖を介してリボソームの外水相
膜にのみ結合した反応性リボソームを得た（平均粒径 1
87 nm、CV 値 18 %）。また、5℃で3週間保存し
た後の平均粒径は 193 nm（CV 値 21 %）であり、
安定性に優れていた。
【化 27】

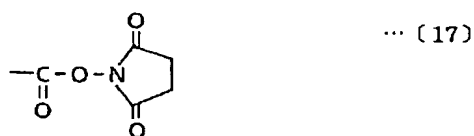
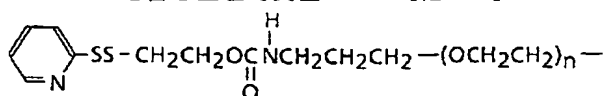


n ≅ 68

【0067】実施例 1-7

実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体の 10 wt % を含む生理的食塩水に代え
て、下式〔17〕で表わされる反応性ポリオキシア
ルキレン誘導体 5 wt % および α-メチルカルボニル（N-
オキシコハク酸イミド）-ω-メトキシ ポリオキシエ
チレン（分子量 3000）10 wt % を含む生理的食塩

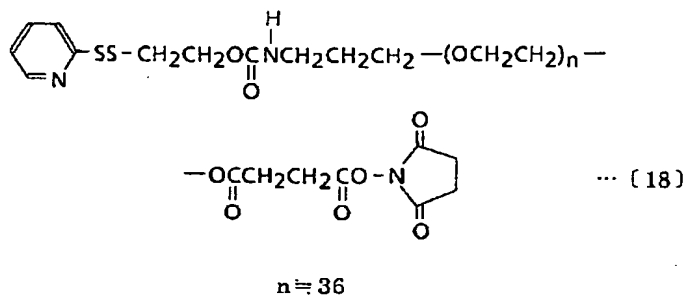
水 1 ml を用いることにより、ピリジンジスルフィド基
がポリオキシア
ルキレン鎖を介してリボソームの外水相
膜にのみ結合した反応性リボソームを得た（平均粒径 1
99 nm、CV 値 19 %）。また、5℃で3週間保存し
た後の平均粒径は 211 nm（CV 値 24 %）であり、
安定性に優れていた。
【化 28】



n ≅ 68

【0068】 实施例 1-8

実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性ポリオキシアルキレン誘導体の 10 wt % を含む生理的食塩水に代えて、下式〔18〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体 1 wt % および α -メチルカルボニル (N-オキシコハク酸イミド) - ω -メトキシ ポリオキシエチレン (分子量 3000) 10 wt % を含む生理的食塩



【0069】 实施例 1-9

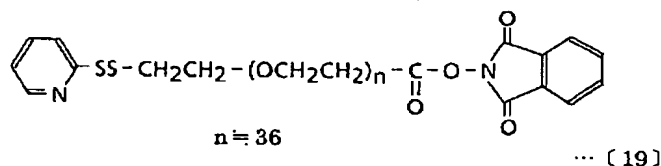
実施例 1-1 と同様にして、ただし反応性ポリオキシアルキレン誘導体の 10 wt % を含む生理的食塩水に代えて、下式〔19〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体 1 wt % および α -メチルカルボニル (N-オキシコハク酸イミド) - ω -メトキシ ポリオキシエチレン (分子量 3000) 5 wt % を含む生理的食塩水

水1mℓを用いることにより、ピリジンジスルフィド基がポリオキシアルキレン鎖を介してリボソームの外水相膜にのみ結合した反応性リボソームを得た（平均粒径187nm、CV値17%）。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は191nm（CV値21%）であり、安定性に優れていた。

【化 2 9】

1 mlを用いることにより、ビリジンジスルフィド基がポリオキシアルキレン鎖を介してリポソームの外水相膜にのみ結合した反応性リポソームを得た（平均粒径183 nm、CV値17%）。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は192 nm（CV値18%）であり、安定性に優れていた。

【化30】



【0070】 实施例2

西洋わさびペルオキシダーゼに 3- (2-ピリジルチオ) プロピオン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルを反応させ、さらにメルカプトエタノールによりジチオピリジル基を還元させて、チオール基を導入した西洋わさびペルオキシダーゼ (以下、チオール化 HRP と略す) を得た。次に、実施例 1-1 で得られた反応性リポソームの懸濁液 500 μ l に、チオール化 HRP を 1 mg 溶解させた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml を加え、4℃ で 24 時間攪拌し、HRP をリポソームの外水相膜に固定化した。反応終了後、Sephadex G-50 を用いてゲル濾過し、含リポソーム画分を分取した。これに、HRP の基質である 1, 2-フェニレンジアミン溶液 (10 mmol/l) 0.1 ml を加え、30℃ で 10 分間インキュベートし、さらに 0.1 N 硫酸 10 μ l を加えたところ、褐色の呈色が見られた。この結果から、実施例 1-1 の反応性リポソーム

30 は、チオール化HRPと攪拌するだけで容易にHRPを固定化できることが確認できた。

【0 0 7 1】比較例 1

卵黄ホスファチジルコリン 20 mg (26 μ mol)、
コレステロール 3.9 mg (10 μ mol) およびパ
ルミトイルホスファチジルエタノールアミン 2.8 mg
(4 μ mol) のみを用いて、実施例 1-1 と同様の操
作により、固形分量約 0.25% の大きな一枚膜リボ
ソームを得た。このリボソームに実施例 2 と同様にチ
オール化 HRP を反応させ、ゲル濾過により精製した。
次に 1, 2-フェニレンジアミン溶液 (10 mmol/l /
l) 0.1 ml を加え、30℃ で 10 分間インキュベ
ートし、さらに 0.1 N 硫酸 10 μ l を加えたが、発色は
見られなかった。この結果から、ビリジンジスルフィド
基を持たないリボソームではチオール化 HRP を固定で
きないことがわかる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 D 213:70

233:56)